

A szerinfoszforiláció szabályozó szerepe a B sejtek immunoreceptor tirozin alapú aktiváló motívumok által közvetített jelátvitelében.

A II típusú IgG kötő Fc receptorok (FcγRIIb) régóta ismert B sejt szabályozó funkciója az utóbbi évek során újra a figyelem középpontjába került. Az antigént és IgG-t tartalmazó immunkomplexek a B sejtekhez kötődve B sejt receptor (BCR)-FcγRIIb aggregátumokat hoznak létre, ahol a BCR keresztkötés által aktivált *lyn* protein tirozin kináz foszforilálja az FcγRIIb immunreceptor tirozin alapú inhibitoros motívumát (ITIM). A foszforilált ITIM (pITIM) ezt követően SH2 doménekekkel rendelkező jelátviteli fehérjéket köt meg, ilyen a foszfatidil inozitol 5-foszfátáz (SHIP), és a fehérje tirozin foszfátáz SHP2. Ezek aktiválódása a sejtmembrán foszfatidil inozitol 3,4,5 triszfoszfát (PIP3) szintjének csökkenését eredményezi, ami a továbbiakban a sejten belüli szabad $[Ca^{2+}]$, valamint az Akt és az extracelluláris szignálok által szabályozott kináz (Erk) aktiválódásának csökkenéséhez, s végül az ellenanyag termelés gátlásához vezet. A B sejteknek ez az autokrin szabályozási lehetősége fontos szerepet játszhat auto-antitestek termelésének gátlásában, s így az immunválasz szabályozásában. Autoimmun betegek egy csoportjánál (szisztémás lupus erithematosusban) összefüggést találtak az FcγRIIb polimorfizmusa és a betegség kialakulása között. Kimutatták azt is, hogy FcγRIIb-génkiütött egerekben (a megfelelő genetikai háttér mellett: DBA1 egértörzsben) anti-DNS ellenanyagok és lupusz-szerű tünetek jelennek meg, és vesekárosodást okozó, immunkomplexek által előidézett gyulladás alakul ki. A szisztémás autoimmun betegségek hátterében álló patomechanizmus felderítésére irányuló munkában az FcγRIIb által szabályozott folyamatok kutatása előtérbe került.

Korábban kimutattuk, hogy emberi limfocitákban a BCR által kiváltott sejtaktiválás eredményeképpen az FcγRIIb maga is szerin foszforiláció áldozatává válik, amelynek funkcionális jelentősége nem ismert. Leírták azt is, hogy a szerin foszforilációja egy tirozin foszforilációs hely közelében gátolhatja az utóbbi által közvetített jelátviteli folyamatokat. A humán FcγRIIb sejten belüli doménje - az egértől eltérően - a membrán közelében tartalmaz egy szerin maradékot is, olyan motívum közelében, amelyenhez hasonlóak az irodalmi adatok alapján dokkoló helyül szolgálhatnak a mitogén aktivált kinázok (MAPK) számára. E motívumok közös sajátága, hogy a több pozitív töltésű aminosavból álló szekvenciát hidrofób aminosavak vesznek körül.

Jelen vizsgálataink célja az FcγRIIb intracelluláris doménje szerint tartalmazó, sejtmembrán-közelbeli szekvencia részlete és a MAPK kölcsönhatásának, valamint az FcγRIIb szerinen történő foszforilációja funkcionális következményeinek felderítése volt, továbbá szeretnénk volna jobb betekintést nyerni az FcγRIIb által szabályozott folyamatokba.

Szerin tartalmú motívum ebben a pozícióban csak a humán FcγRIIb-ben található meg, az egér B sejtek Fc receptoraiban nincs jelen. Feltételeztük, hogy a potenciális foszforilációs helyként számításba jövő motívum részt vesz az emberi B sejtek FcγRIIb -től függő, immunkomplexek által közvetített szabályozásában.

YCRKKRIS²⁵³ALPGYPECREMGETLPEK²⁹²PANPTNPDEADKVG²⁹²AENTIT²⁹²Y²⁹²SLLMHPDA

1. ábra. Az emberi FcγRIIb intracelluláris doménjének aminosav szekvenciája. A 253szerin körüli motívumot reprezentáló peptid (RK-PG): kék, az ITIM-nek megfelelő szekvencia: lila, az FcγRIIb1-ben található inzert: aláhúzott, dőlt betű. A sárgával kiemelt szakaszok mutatják a szerint és tirozint egyaránt tartalmazó hosszú peptidet felépítő szekvenciát (az első és utolsó két aminosav alapján RK-HP).

Vizsgálatainkat több szinten folytattuk. Egyrészt Fc γ RIIb-t expresszáló B sejtvonalon (BL41 Burkitt limfóma) vizsgáltuk a mitogén aktivált kinázok (MAPK) kötődését az Fc γ RIIb –hez, valamint ennek következményeit. Másrészt különféle Fc γ RIIb –vel transzfektált sejteket hoztunk létre, amelyek eddig nem álltak rendelkezésre, a humán Fc γ RIIb funkciójának tanulmányozására. Továbbá a receptor intracelluláris szakaszainak megfelelő, szintetikus foszfopeptidek segítségével vizsgáltuk az Fc γ RIIb–hez kapcsolódó molekulákat, és e foszfopeptidek jelátviteli utakra kifejtett hatását. Az IgG CH2 domén rész-szekvenciájának megfelelő szintetikus peptid segítségével meghatároztuk az Fc γ RIIb–hez kötődő legkisebb, funkcionálisan még aktív ligandumot. Végül megvizsgáltuk B sejtekben a MAPK aktivitás és a receptor leválás („Fc γ RIIb shedding”) esetleges összefüggését.

MAPK dokkoló hely az Fc γ RIIb-on

In vitro kináz assay-ben nyert eredményeink szerint a BCR-en keresztül stimulált sejtekben az enzimatisan aktív Erk MAPK kapcsolódik az Fc γ RIIb –hez. Az Erk1/2-re specifikus ellenanyaggal való próba azt mutatta, hogy többféle aktív Erk kötődött az Fc γ RIIb –hez a BCR/Fc γ RIIb kereszt-kötött mintákban. Fc γ RIIb negatív sejtől (ST486) izolált kontrol minta nem mutatott enzimaktivitás növekedést BCR stimulust követően. Az Fc γ RIIb–Erk1/2 asszociációt a feltételezett MAPK dokkoló helynek megfelelő szintetikus peptiddel próbáltuk blokkolni. Az RKKRIS²⁵³ALPG peptid mind foszforilált, mind foszforilálatlan formában gátolta nemcsak az Erk1/2, hanem más MAPK-ok (85kDa, 56kDa) kötődését is a receptorhoz, ami arra utal, hogy ez a motívum valóban MAPK-ok dokkoló helye az Fc γ RIIb-on. Arra vonatkozólag, hogy a MAPK foszforilálja-e a receptort *in vivo* körülmények között, pillanatnyilag nincs közvetlen bizonyítékunk.

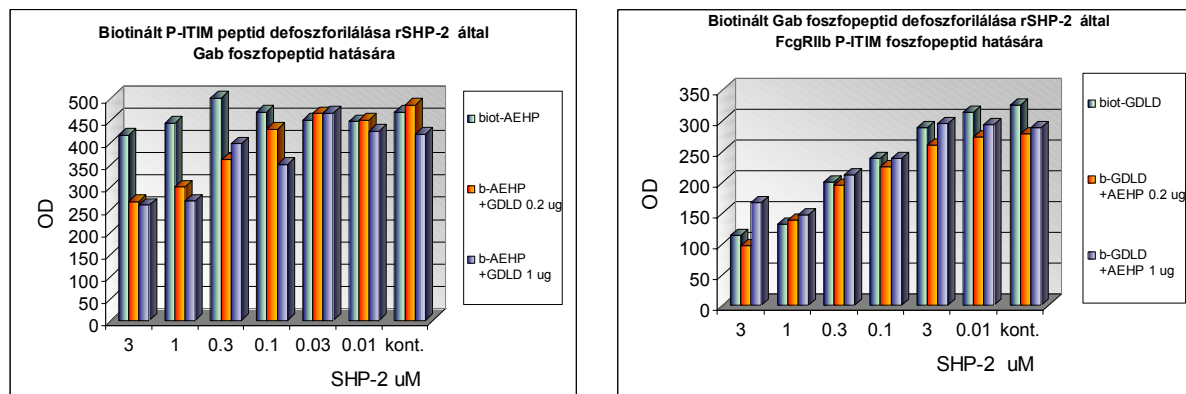
A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a RKKRIS²⁵³ALPG peptid kötődik-e és milyen körülmények között a MAPK-okhoz. Az avidinnal fedett Sepharose gyöngyökre felkötött peptid kizárólag aktivált B sejtek detergenssel nyert kivonatából kötötte meg a p85, p56 és p42/44 MAPK-okat, függetlenül foszforiláltságától. Okadánsav foszfatáz gátló jelenlétében a kötődés jelentős mértékben felerősödött. Az okadánsavról ismert, hogy amellett, hogy a PP1 és PP2a foszfatázok specifikus gátlószere, s így megakadályozza az Erk defoszforilációját, aktiválhatja is az Erk1/2-t. Ez az eredmény tehát megerősíti, hogy csak az aktív, foszforilált formában levő Erk kapcsolódik a megfelelő docking motívumhoz, továbbá azt mutatja, hogy a kötődés foszfatázok ellenőrzése alatt áll. **Elsőként igazoltuk tehát, hogy aktív MAP kinázok valóban kötődnek az Fc γ RIIb -n levő dokkoló helyhez (RKKRISAL) és így az aktivált B sejtekben foszforilálhatják magát a receptort és/vagy más, ahhoz kötődő fehérjét.**

Szintetikus Fc γ RIIb foszfopeptidekhez kötődő fehérjék azonosítása, a foszfopeptidek SHP-2 aktiváló hatása

Elkészítettük a szerin és tirozin aminosavakat is tartalmazó Fc γ RIIb peptideket (l. 1. ábra), amelyeken a szerin, vagy a tirozin, vagy mindkét aminosav foszforilálva volt, illetve egyik aminosav sem volt foszforilált. A peptidekkel sikerült különféle fehérjéket kihúzni aktivált B sejtek detergens extraktumából. Fehérjefestés alapján a foszfopeptidekhez kötődő fehérjéket találtunk 50, 70, 85 és 110 kDa molekulatömeg tartományban. Megállapítottuk, hogy a foszfortirozint tartalmazó peptidekhez lényegesen több fehérje kapcsolódott. Kizárólag a foszfortirozint tartalmazó peptidekkel lehetett kimutatni tirozinon foszforilált fehérjék kapcsolódását, a csak foszfoserint tartalmazó peptidekkel nem. A RK-HP foszfopeptidhez kötődött fehérjék között korábbi eredményeinkkel megegyezően azonosítottuk a *lyn* protein tirozin kinázt, az SHP-2 foszfatázt, a Grb 2 asszociált binder (Gab1) adaptor fehérjét, valamint a foszfatidil inozitol 3-kinázt (PI3-K). Megfigyeltük, hogy a foszfoserint és

foszfotirozint egyaránt tartalmazó peptidhez kevesebb *lyn* kötődött, mint a csak a foszfotirozint tartalmazóhoz, ami arra utal, hogy a szerin foszforilációja szabályozhatja a Fc γ RIIb-től függő gátlás alapfeltételét, az Fc γ RIIb ITIM tirozinon történő foszforilációját. A szerin foszforilációjának hatására a foszfopeptid ITIM motívumával kölcsönhatásba lépő többi molekula kötődésében mennyiségi különbségeket nem találtunk (SHP-2, PI3-K, Gab1).

Megvizsgáltuk a foszfopeptidek hatását az SHP-2 tirozin foszfatázra, amely az általunk korábban felállított modell szerint felelős az Fc γ RIIb által közvetített B sejt gátlásért (2. ábra).



2. ábra. SHP2 foszfatáz aktiválása pITIM és Gab1 foszfopeptidek által. Rekombináns SHP2-t GST fúziós fehérje formájában állítottuk elő. A foszfatáz aktivitásának mérésére ELISA alapú rendszert állítottunk be. Az SHP2 aktivitást biotinnal jelölt foszfopeptidekkel szemben vizsgáltuk, amelyeket avidinnal fedett ELISA lemezhez kötöttünk, majd a tirozin foszforiláció mértékét anti-foszfotirozin ellenanyag segítségével mértük vissza.

Kimutattuk, hogy a foszfatázt a Gab1 DG-LD peptide hatékonyan aktiválja, míg a pITIM (AE-HP) csak kevésbé. Amikor a két peptidet együtt adtuk, a Gab1 peptid fokozta az SHP-2 pITIM-re kifejtett hatását, vagyis Gab1 peptid aktiválja a foszfatázt, míg a pITIM szubsztrátként szerepel. A két foszforilált motívum együttműködik az SHP-2 aktiválása során, aminek az Fc γ RIIb-től függő gátlás során lehet finomszabályozó szerepe.

Összehasonlítottuk a különböző foszforilációs formájú RK-HP peptideket is a fent leírt foszfatáz assay-ban. A szerin és tirozint is foszforilált formában tartalmazó Fc γ RIIb peptid kissé jobban aktiválta az SHP2-t mint a csak foszfotirozint tartalmazó, de a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

Az Fc γ RIIb szerin foszforilációjának további vizsgálata céljából nyulakban ellenanyagot állítottunk elő a KHL hordozóra kötött **RKKRISALPG** foszfopeptiddel szemben, majd megvizsgáltuk mit ismer fel a kimerített, tisztított ellenanyag F(ab)₂ fragmense. Az ellenanyag gyenge reakciót mutatott a receptorral, de számos más fehérjét is felismert a B sejtek lizátumában, így a nagy mértékű nem specifikus háttér reakció miatt a továbbiakban az ellenanyagot nem tudtuk alkalmazni.

Az Fc γ R1Ib kötőhelyének térképezése az IgG molekulán

A Fc γ R1Ib-n keresztül történő sejtstimulációhoz a receptorhoz kötődő legkisebb, még hatékony ligandumot szeretnénk volna azonosítani. Ezért a humán IgG1 CH2 doménje szekvenciájának a kapocsrégió felőli részét átlapoló 8 tagú szintetikus peptid segítségével térképeztük. Azonosítottuk azt a legrövidebb peptidet, amely kötődött mind B sejteken, mind monocitákon kifejezett Fc γ R1Ib-hez, és felismerte a szolubilis rekombináns Fc γ R1Ib-t is ELISA rendszerben. A ligandumkötődés vizsgálatához előállítottunk Fc γ R1Ib –vel transzfektált B sejtvonalat, (S2B), az eredetileg Fc γ R1Ib negatív ST486 Burkitt limfoma sejtekből. Ez a szintetikus peptid (²⁵⁶TPEVTC(Acm)VVDVSHEDP²⁷¹), melynek kötődési affinitása $K_D = 6 \mu\text{M}$, biotinált formában avidinnel kereszt-kötve gátolta a BCR által indukált Ca^{2+} jelet B sejtekben, továbbá monocita sejtvonal (Monomac) sejtekből TNF α és IL-6 gyulladási citokinek felszabadulását váltotta ki. A Monomac sejtek Fc γ R1Ia-t fejeznek ki, melynek extracelluláris doménjei csaknem azonosak az Fc γ R1Ib –val, de az intracelluláris doménjük eltér. A Fc γ R1Ia aktiváló típusú receptor, ligandum által történő kereszt-kötése citokinek felszabadulását eredményezheti. A citokintermeléshez vezető jelút egyik fontos eleme az Erk foszforiláció. Eredményünk szerint a biotinált TP peptid avidinnal való kereszt-kötés után alkalmas ERK aktiváció kiváltására. Ugyanakkor a nem komplexben levő peptid nem volt képes gátolni az aggregált Ig által kiváltott választ, feltehetőleg a komplex kisebb mérete, és a kötődés alacsonyabb affinitása miatt. Az általunk azonosított peptid komplex formában alkalmas az Fc γ R1Ib-n keresztüli szignalizáció további vizsgálatára.

Fc γ R1Ib–vel transzfektált sejtek előállítása, az Fc γ R1Ib–től függő funkciók tanulmányozása vad típusú és ser/ala cserét tartalmazó receptorral transzfektált sejtekben

Az Fc γ R1Ib szerin foszforilációja szerepének további vizsgálatára olyan vektorokat állítottunk elő irányított mutagenézissel, amelyek az Fc γ R1Ib1-ben ser/ala cserét tartalmaznak. A vad és mutáns Fc γ R1Ib1-eket tartalmazó vektorokkal Fc γ R1Ib negatív B sejteket (ST486) transzfektáltunk. Az irányított mutációt és a transzfektánsokat a párizsi Laboratoire d'Immunologie Cellulaire & Clinique INSERM U. 255 Institut Biomédical des Cordeliers INSERM Marc Daeron által vezetett laboratóriumával kollaborációban készítettük el.

Mutáció létrehozása

Az eredetileg FcR negatív ST486 sejtvonalat transzfektáltuk vad típusú illetve a mutációt hordozó pNT emlős expressziós vektorral. A mutáns receptor hordozó konstrukciót a vad típusú gént tartalmazó vektorból állítottuk elő a Promega cég által forgalmazott „Gene editor” nevű helyspecifikus mutációs készlettel. A módszer lényege, hogy a pontmutációt hordozó oligonukleotid mellett egy ún. szelekciós oligonukleotidot is hibridizáltatunk a kiindulási vektor azonos láncához, mely megváltoztatja a vektorban lévő antibiotikum-rezisztenciáért felelős gént. Így a megváltozott rezisztenciájú és egyben a kívánt mutációt hordozó klónok speciális antibiotikum keverékkel szelektálhatók.

Immunprecipitációs vizsgálatok - a fehérjefoszforiláció összehasonlítása vad típusú és ser/ala mutáns Fc γ R1Ib-rel rendelkező B sejtekben

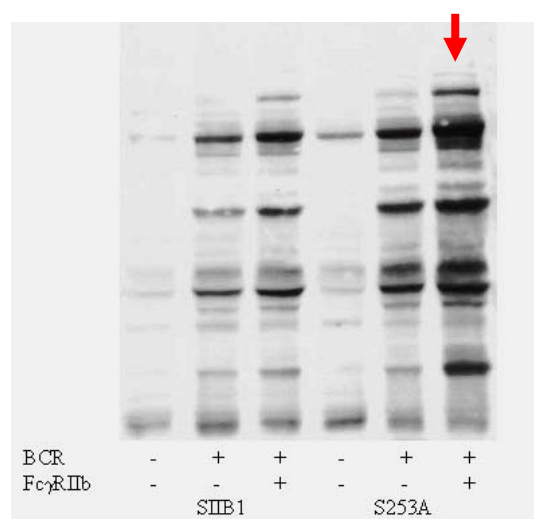
Jelátvitelben szerepet játszó molekulák esetében több esetben is igazolták, hogy egy adott molekula szerin foszforilációja negatívan befolyásolja a molekula tirozin-foszforiláció indukálta funkcióját. Az Fc γ R1Ib intracelluláris részén elhelyezkedő, általunk leírt MAPK-kötő motívumban levő szerin szerepének tisztázására elkészítettünk két transzfektált sejtvonalat az eredetileg FcR negatív ST486 humán Burkitt lymphoma sejtekből. Az SIIB1 elnevezésű sejt a vad típusú receptort hordozta, míg az S253A az említett (253-as pozícióban levő)

szerin helyett alanint tartalmazó receptort fejezte ki. A két receptor működését, a hozzájuk kapcsolódó molekulákat hasonlítottuk össze.

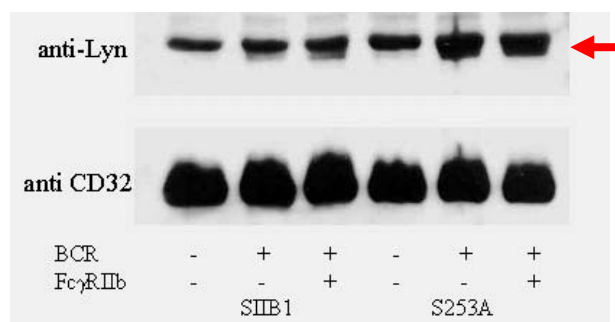
Immunprecipitáció és Western blot technika segítségével vizsgáltuk, hogy a 253-as szerint nem tartalmazó mutáns receptort expresszáló S253A sejtek esetében a receptor működése, és receptorhoz asszociált molekulák mennyiben térnek el a vad típust kifejező SIIB1 sejtekhez képest. Kontroll (nem stimulált), B-sejt receptoron (BCR) keresztül stimulált és BCR-Fc γ RIIb keresztkötött mintákat hasonlítottunk össze a kétféle sejtípus esetében. A BCR-en keresztüli aktivációt egér anti humán IgM-mel és kecske anti egér IgG-vel végeztük. A BCR-Fc γ RIIb keresztkötött minták esetében ez előzőekhez képest még egér anti humán CD32-t adtunk a sejtekhez. A stimulálást 2-5 percig 37°C-on végeztük, majd a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Ezt követte a sejtek lízise detergenst (Triton X-100) és proteáz ill. foszfatáz gátlókat tartalmazó pufferben. Az így nyert lizátumokat protein G agarózon immobilizált ellenanyagokkal inkubáltuk. A kötődött fehérjéket poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el, majd nitrocellulóz membránra vittük át. A membránt specifikus ellenanyagokkal blottoltuk a fehérjék azonosítása céljából.

Anti-foszfotirozinnal precipitált mintákat anti-foszfotirozin ellenanyaggal blottolva azt tapasztaltuk, hogy a BCR-Fc γ RIIb keresztkötött minták esetében az S253A sejtek intenzívebb tirozinfoszforilációs mintázatot mutatnak (3. ábra). Ugyanígy a mutáns Fc receptor hordozó sejtek esetében nagyobb mennyiségű Lyn Src kináz asszociálódott a receptorhoz (4. ábra). Ez egybevág korábbi eredményünkkel, amelyben a fokozott lyn kötődést mutattunk ki a foszfoszerint nem tartalmazó, foszfotirozin tartalmú Fc γ RIIb foszfopeptidehez. Az is megfigyelhető volt, hogy a p85 Erk izoforma, illetve a 41-42 kDa-os Erk1/2 nagyobb mértékben asszociálódott a S-A mutációt hordozó S253A sejtek Fc receptorához (5. ábra). További, a receptor jelátvitelében fontos általunk vizsgált fehérjék Fc γ RII-höz való kötődése nem mutatott eltérést a vad típusú és a mutáns receptor között.

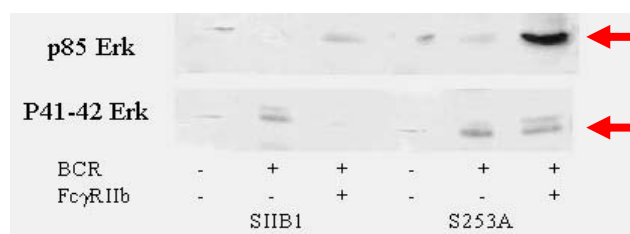
Vizsgáltuk az Erk és az Akt kinázok aktivációjának kinetikáját is az említett két sejtípus esetében. A sejtekben különböző ideig idéztünk elő BCR-en keresztüli aktivációt, illetve BCR-Fc γ RIIb keresztkötést. A kétféle receptort hordozó sejtek Erk és Akt aktivációjának kinetikája nem mutatott lényeges eltérést.



3. ábra. Szerin/alanin cserét tartalmazó Fc γ RIIb-ral transzfektált sejtekben BCR-Fc γ RIIb keresztkötést követően a tirozinon foszforilált fehérjék mennyisége növekszik. Anti-foszfotirozin immunprecipitált minták, anti-foszfotirozin immunoblot.



4. ábra. Szerin/alanin cserét tartalmazó FcγRIIb-ral transzfektált sejtekben BCR-en keresztül aktivált mintákban az FcγRIIb-hez kapcsolódó *lyn* mennyisége megnőtt. Anti-CD32 immunprecipitációval izolált mintákat Lyn, illetve kontrollként CD32 specifikus ellenanyagokkal vizsgáltuk az immunoblotton.



5. ábra. Szerin/alanin cserét tartalmazó FcγRIIb-ral transzfektált sejtekben (S253A) BCR-FcγRIIb keresztkötést követően megfigyelhető a 85 kDa és a 41/42 kDa Erk fokozott kötődése az FcγRIIb-hez. Anti-CD32 immunprecipitátum, anti-pan-Erk ellenanyaggal blottolva.

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a ser/ala csere mellett több *lyn* kapcsolódik a tirozinon foszforilált FcγRIIb-hez, ami fokozott BCR-indukált fehérje tirozin foszforilációt tesz lehetővé B sejtekben. A vad típusban jelenlevő szerin a BCR-en keresztül érkező jel hatására foszforilálódik és feltehetőleg az aktivációs küszöb emelésével mintegy „féken tartja” sejtaktivációt. Ugyanakkor a vad és mutáns receptorokat hordozó sejtekben a BCR/FcγRIIb keresztkötés által kiváltott Ca^{2+} jelet összehasonlítva, illetve az Erk és Akt foszforiláció vizsgálatakor nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, ami arra utal, hogy a szerin foszforilációja nem befolyásolja az FcγRIIb-től függő $[Ca^{2+}]$ szabályozást, Erk illetve Akt aktiválódást.

Apoptózis vizsgálatok

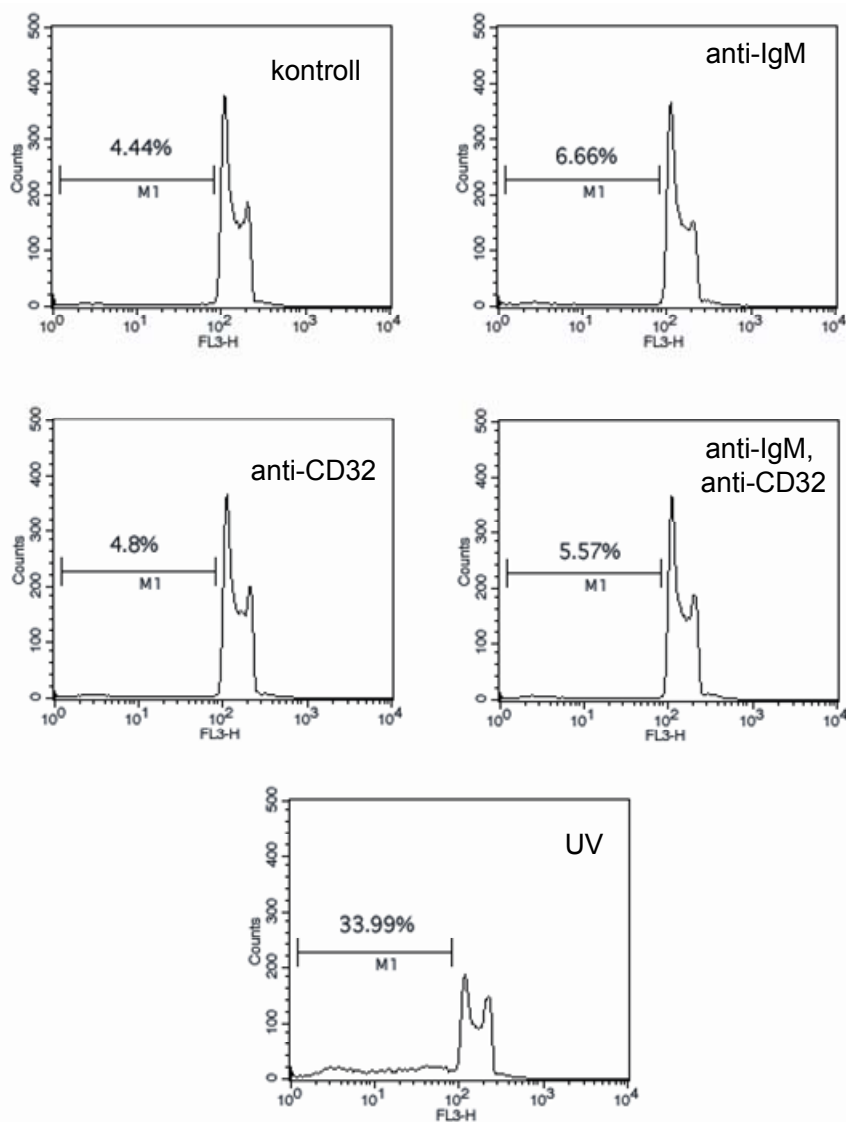
Az irodalomban fellelhető adat, hogy az FcγRIIb anti-CD32 ellenanyaggal történő keresztkötése apoptózist indukálhat egér B sejteken. Vizsgáltuk, hogy a mutáns és a vad típusú FcγRIIb-t hordozó két sejtvonal az S11B1 illetve az S253A esetében milyen hatása van a receptoron belüli mutációnak (a 253-as szerin hiányának) az FcγRIIb-n keresztüli apoptózis indukciójában. A sejteket anti-humán CD32 ellenanyaggal inkubáltuk egy éjszakán át, majd másnap propídium jodidos festéssel áramlási citofluoriméteren követtük az apoptotizáló sejtek arányát. Kísérleteink során azonban bebizonyosodott, hogy a vizsgált két sejtben (és egyéb humán B-sejtvonalakban) az FcγRIIb keresztkötése nem indukál apoptózist (6. ábra).

Vad típusú- és Ser>Ala mutáns Fc γ RIIb-transzfectált ST486 sejteket ($2,5 \times 10^5$ sejt/1 ml/lyuk) 24 órán át 37 °C-on inkubáltunk ellenanyaggal fedett 24-lyukú sejtenyésző lemezen az alábbi elrendezésben:

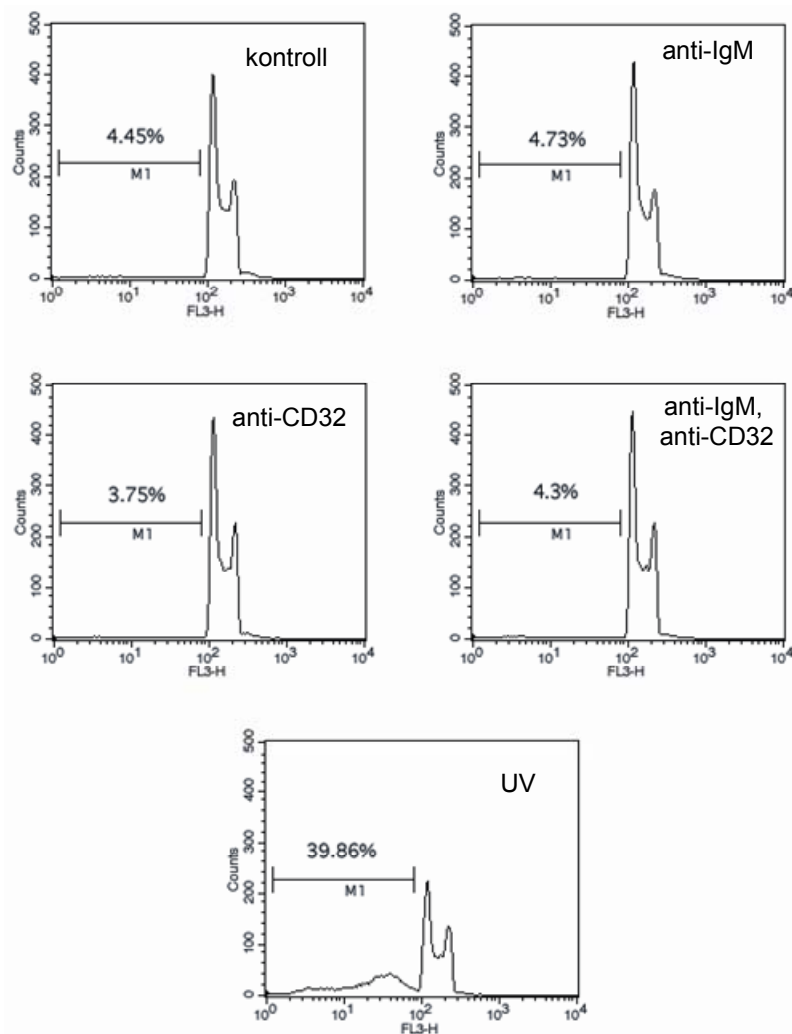
- kontroll (ellenanyag nélkül)
- anti-humán IgM, 2 μ g/ml coat
- anti-humán CD32, 10 μ g/ml coat
- anti-humán IgM (2 μ g/ml), anti-humán CD32 (10 μ g/ml) coat
- pozitív kontroll (ellenanyag nélkül, 25 sec UV-besugárzás)

A sejteket egyszeri mosást követően további 5 órán át + 4 °C-on DNS-extraháló, propidium-jodid-tartalmú hipotóniás citrát-pufferben inkubáltuk. Végül áramlási citométeren mértük a propidium-jodid fluoreszcencia intenzitását (FL3 csatorna, 10000 sejt/minta) és meghatároztuk a csökkent DNS-tartalmú szubdiploid sejtpopuláció százalékos arányát.

vad típusú Fc γ RIIb-transzfectált ST486



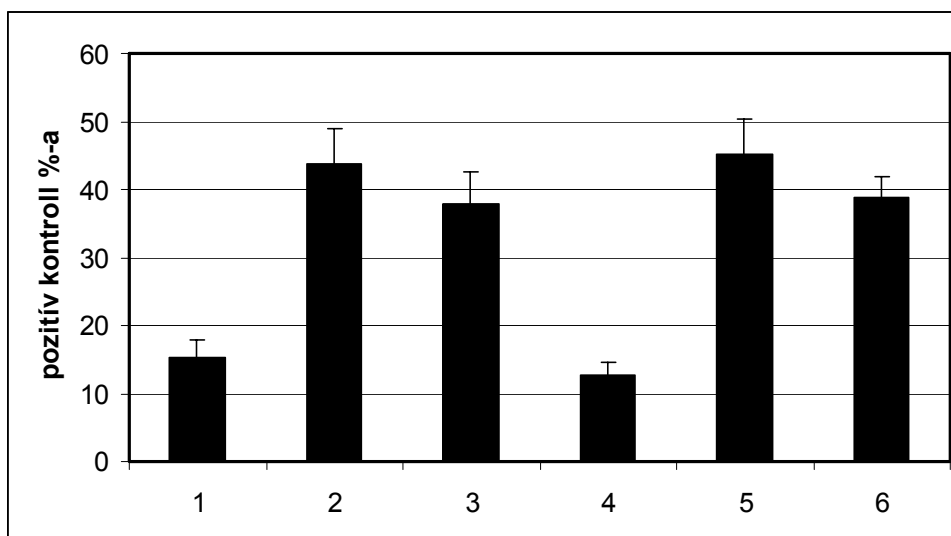
Ser>Ala mutáns Fc γ RIIb-transzfectált ST486



6.ábra. DNS-fragmentáció vizsgálata Fc γ RIIb-transzfectált humán ST486 B-sejtvonalon. Az Fc γ RIIb keresztkötése nem indukál DNS fragmentációt. M1:szubdiploid sejtek.

NF κ B aktiválódás

Azt is vizsgáltuk, milyen hatással van a szerin mutációja az Fc γ RIIb NF κ B aktivációt befolyásoló tulajdonságára. A sejteket a különböző kezeléseken (BCR stimuláció, BCR-Fc γ RIIb keresztkötés) lecentrifugáltuk, majd enyhe detergenses hipotóniás oldatban sejtmagot izoláltunk belőlük. A sejtmagokat nagyobb koncentrációjú és magasabb sótartalmú oldattal feltártuk, és a sejtmagba transzlokálódott aktiválódott NF κ B transzkripciós faktor mennyiségét vizsgáltuk a Chemicon cég által forgalmazott ELISA rendszerrel. Adataink alapján nem mutatkozik lényeges különbség a két sejttípus között.

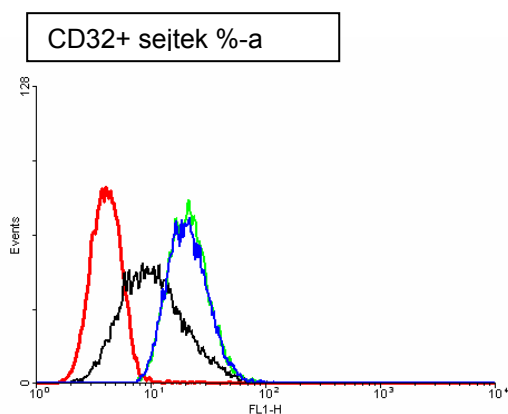


7. ábra. Az SIIB1 és S253A sejtek NFB aktivációjának összehasonlítása. 1: SIIB1 nem stimulált, kontroll; 2: SIIB1 BCR stimulált; 3: SIIB1 BCR-Fc γ RII keresztkötött; 4: S253A nem stimulált, kontroll; 5: S253A BCR stimulált; 6: S253A BCR-Fc γ RII keresztkötött. Az értékek a cég által biztosított pozitív kontroll minta értékeinek százalékában vannak feltüntetve.

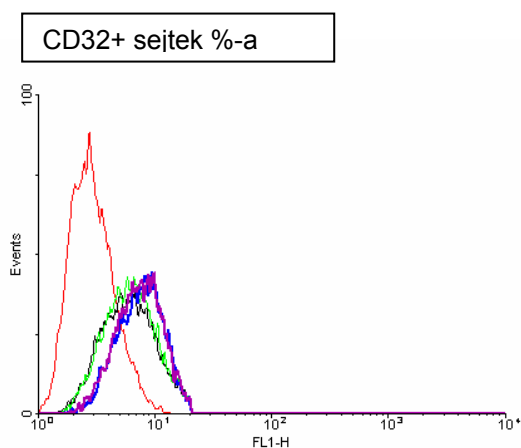
Fc γ RIIb leválás („shedding”) és a MAPK

Korábban munkacsoportunk leírta, hogy aktivált B sejteken megjelenik egy sejtfelszíni tripszinszerű szerin proteáz, melynek szerepe van az Fc γ RII sejtfelszínről való leválásában. Munkánk során vizsgáltuk, vajon a szerin tartalmazó MAPK-kötő motívumnak milyen szerepe van a receptor expresszió szabályozásában. Nemrégiben Margaret M. Chou és munkacsoportja is leírta, hogy az Erk MAPK szerepet játszik az MHCII molekula endoszomális transzportjának és így sejtfelszíni kifejeződésének regulálásában (Robertson S.E. et al. Mol Biol Cell 2006 17:645-657). Kísérleteinkben az U0126, a MEK (a MAPK aktiválásáért felelős kináz) specifikus gátlószere alkalmazásával kikapcsoltuk a MAPK közvetített szabályozó funkciót. Különböző B-sejtvonalak sejtjeit és mandulából izolált primer sejtjeit inkubáltunk az említett gátlószerezrel, majd áramlási citofluorimetriával FITC-cel jelölt anti-humán CD32 ellenanyag segítségével mértük a receptor sejtfelszíni kifejeződésének mértékét.

Eredményeink azt mutatják, hogy a MAPK gátlása Fc γ RIIb expresszió növekedést okoz a BL41/95 Burkitt lymphoma sejtek és mandulából izolált B-sejtek esetében, mely független attól, hogy BCR-en keresztül stimuláljuk-e a sejteket (8. ábra). Ugyanígy percoll gradiensen tonzillából izolált aktivált B-sejteken is hasonló eredményt kaptunk (9. ábra). Nyugvó mandula B-sejteket IgM specifikus ellenanyag segítségével aktiválva megfigyelhető az aktiváció miatt bekövetkező Fc γ RIIb-szám csökkenés. A MAPK gátlása ebben az esetben ezt a csökkent expressziót kompenzálta. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a MAPK-nak szerepe van az Fc γ RII expresszió szabályozásában.



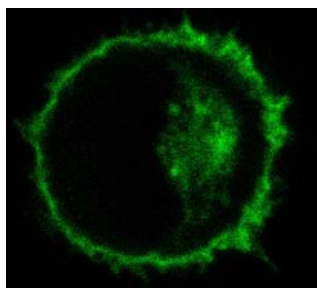
8. ábra. A BL41/95 sejtek $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ expressziójának változása U0126 MEK inhibitor hatására. Piros görbe: negatív kontroll, fekete: anti-CD32 jelölt kontroll, kék: U0126-al kezelt nem stimulált minta, zöld: U0126-al kezelt stimulált minta.



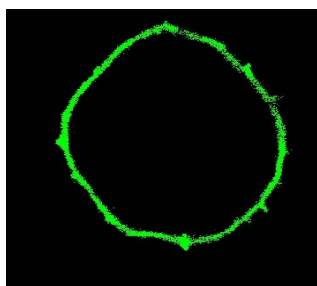
9. ábra. Aktivált mandula B-sejtek $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ expressziójának változása U0126 MEK inhibitor hatására. Piros görbe: negatív kontroll, fekete: anti-CD32 jelölt nem stimulált minta, zöld: anti-CD32 jelölt stimulált minta, kék: U0126-al kezelt nem stimulált minta, lila: U0126-al kezelt stimulált minta.

További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, vajon a MAPK szabályozó szerepe kiterjed-e a receptor internalizációra is. Ebből a célból elkészítettünk olyan konstrukciókat melyek a különböző receptor izoformákat ($\text{Fc}\gamma\text{RIIb1}$ és b2) GFP (green fluorescent protein) fehérjével fuzionáltnak tartalmazzák. A két gént fúziós polimeráz láncreakciós technikával kapcsoltuk össze, majd egy pNT elnevezésű emlős expressziós vektorba klónoztuk XbaI és SacI restrikciós helyek közé. A fluoreszcens fúziós partner a konstrukcióban a receptor C terminálisához (sejten belüli részéhez) kapcsolódik. Ezeket a vektorokat transzfektáltuk BL41 illetve BL41/95 sejtekbe. Így konfokális mikroszkóp segítségével nyomon követhetjük a receptor sejten belüli transzportjának folyamatát.

BL41/95 sejtek Fc γ RIIb1-GFP fúziós fehérjével való transzfektálás után



BL41sejtek Fc γ RIIb1-GFP fúziós fehérjével való transzfektálás után



10. ábra. A Fc γ RIIb1-GFP fúziós fehérjével transzfektált sejtek konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal készült felvétele.

Megfigyelhető, hogy a szerin proteázt kifejező sejtekben (BL4195) a receptor egy része a citoplazmában található, ami egybevetve a korábban tapasztalt felszíni receptor kifejeződés csökkenésével arra utal, hogy az Fc γ RIIb1 elhasadását követően az intracelluláris domén a citoplazmába kerül.

Sejtmembrán permeábilis Fc γ RIIb foszfopeptidek hatása B sejtekben

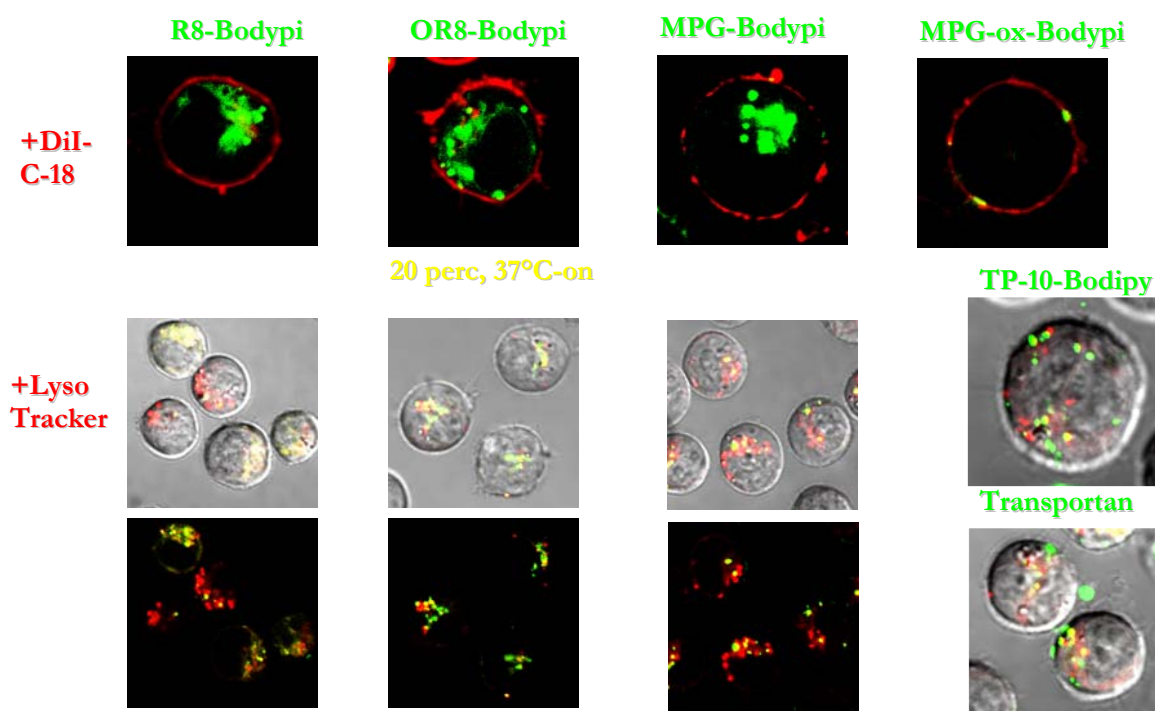
A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az Fc γ RIIb2 intracelluláris részét reprezentáló foszfopeptidek milyen jeleket válthatnak ki B sejtekben, például indukálják-e fehérjék tirozin foszforilációját, vagy az intracelluláris Ca²⁺ szignált. Először lizofoszfátidil kolinnal permeabilizált B sejteket használtunk modellként, a peptidek így a sejtmembránon átjutva közvetlenül a citoplazmába kerültek. A tirozinon nem foszforilált peptidek hatástalanok voltak. A foszfortirozint tartalmazó szintetikus Fc γ RIIb peptid függetlenül attól, hogy a szerin foszforilálva volt-e, jelentős mértékű tirozin foszforilációt váltott ki a B sejtekbe juttatva, ami arra utal, hogy 1) képes volt tirozin kináz(oka)t aktiválni, vagy 2) valamilyen módon felfüggesztette a foszfatazok által fenntartott tirozin foszforiláció gátlást. Ez a rendszer azonban nehezen reprodukálhatónak bizonyult, és a fiziológiástól is távol állt, ezért először sejtmembránon átjutó hordozó peptideket terveztünk és szintetizáltunk, majd ezek segítségével juttattuk be a foszfopeptideket a B sejtekbe.

Különböző sejtmembrán permeábilis hordozópeptidek összehasonlítása után kiválasztottuk az optimális hordozót. Az 1. Táblázatban felsorolt membrán permeábilis hordozók közül néhány toxikusnak mutatkozott, míg más (MGPOx) nem jutott be a sejtbe. Eredményeink szerint a 8 argininből és oktanoilsavból álló hordozó (OR8) alkalmasnak tűnik peptidek sejtbe juttatására (11. ábra). Ez a hordozó átjut a sejtmembránon és nem toxikus a sejtekre.

R8C (HIV-1 Tat 48-60)	RRRRRRRR-C(BODIPY) (-NH₂)
Okt-R8C	Oktanoyl-RRRRRRRR-C(BODIPY) (-NH₂)
MPG alfa(-ox) (HIV-1 gp41 and SV40 NLS nuclear localisation sequence)	C(BODIPY)- GALFLAFLAAALSLM(O)GLWSQPKKRKV (-NH₂)
Transportan (galanin and mastoparan)	C(BODIPY)- GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (- NH₂)
TP10	C(BODIPY)-AGYLLGKINLKALAALAKKIL (- NH₂)

1. Táblázat. Sejtmembrán permeábilis hordozópeptidek. Összehasonlításuk alapján az Okt-R8 C –t kapcsoltuk az AEHP és RKHP peptidekhez.

**MEMBRÁNPERMEÁBILIS HORDOZÓK VIZSGÁLATA KONFOKÁLIS
MIKROSZKÓP SEGÍTSÉSÉVEL BL 41 SEJTEKEN**

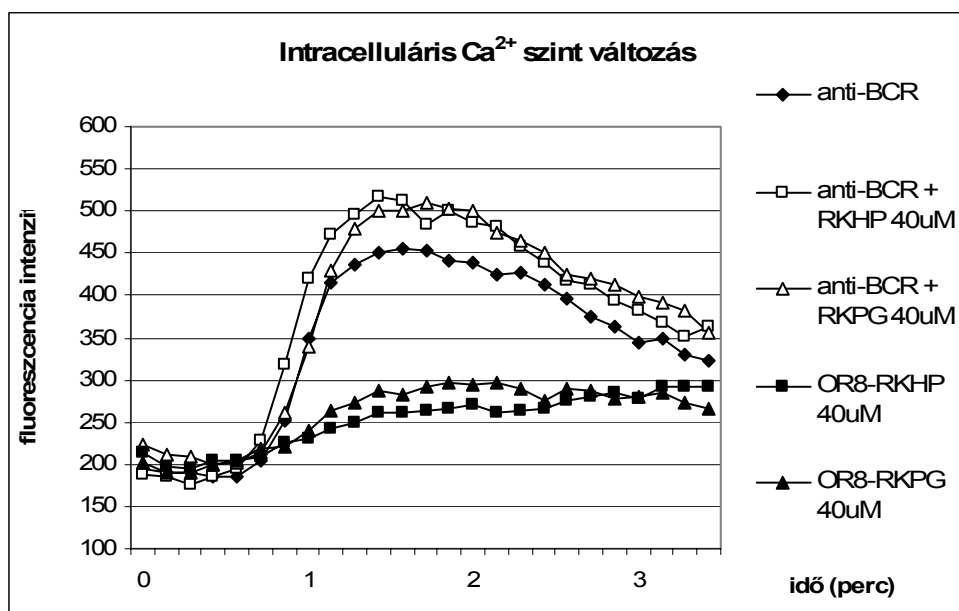


11. ábra. OR8 - Bodipy FL hordozó sejtben belüli lokalizációja. Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópos analízis. A sejtmembránt DiIC18 reagenssel festettük, a savas lizoszómákat Lysotrackerrel azonosítottuk.

A konfokális mikroszkópos felvétel mutatja, hogy az OR8 átjut a sejtmembránon és a sejtben belül nagyrészt a lizoszómákkal együtt lokalizálódik, ahonnan később a citoszólba kerülhet. A további kísérletekhez az OR8C hordozót kapcsoltuk az RKPG és az RKHP foszfopeptidekhez, és az ilyen módon sejtbe juttatott konstrukciók hatását követtük nyomon B sejtek jelpályáinak vizsgálatával.

Fc γ R11b foszfopeptidek hatása az intracelluláris Ca²⁺ szint változásra

Az OR8-peptid konjugátumok hatására kialakuló intracelluláris szabad Ca²⁺ szint változását áramlási citofluometriás módszer segítségével vizsgáltuk humán B-sejtvonalon. BL41 sejteket fluo-3 AM fluoreszcens indikátor festékkel inkubáltuk, amely szabad Ca²⁺ jelenlétében jelentős fluoreszcencia emelkedést mutat. A megfestett sejteket 10% FCS tartalmú RPMI 1640 médiumban vettük fel. Ezt követően, az elpusztult sejteket megfestő, propidium jodid festékkel inkubáltuk a sejteket. A mintákhoz az aktiváló ellenanyagot ill. a peptideket a mérés elindítása után 20 másodperccel adtuk. A mérés FACSCalibur (Becton Dickinson) áramlási citofluoriméterrel végeztük, argon-ion (488nm) fényforrást alkalmazva.



12.ábra: Az OR8-RK-HPnpp (csak tirozinon foszforilált), OR8-RK-PG (szerinen foszforilált) peptidek hatására kialakuló kalcium válasz, ill. a peptidek és az anti-BCR együttes hatása

A foszfoszerint tartalmazó, rövidebb RK-PG peptid és a szerinen nem, de tirozinon foszforilált, hosszabb RKHP peptid egyaránt igen alacsony mértékű Ca²⁺-szint emelkedést indukált 40 μ M-os végkoncentrációnál. A peptidekkel és anti-BCR-el együtt kezelt sejtekben a válasz additív hatást mutat.

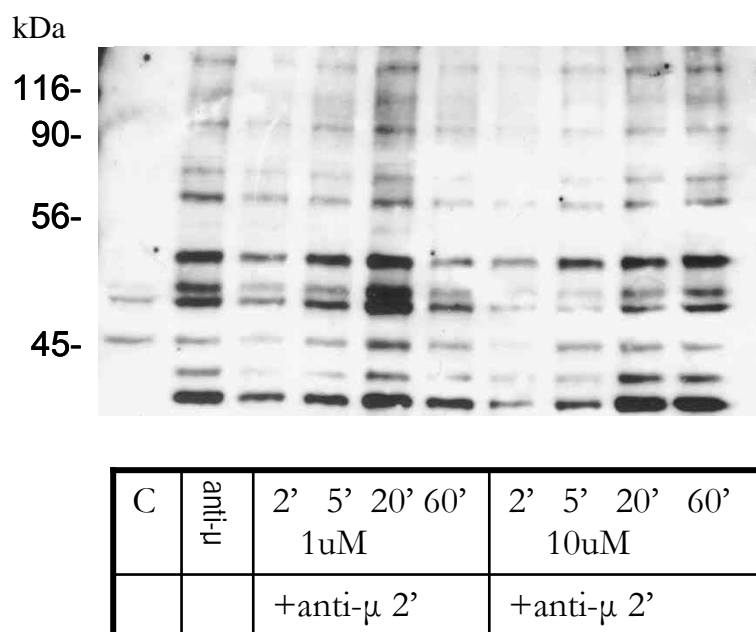
A fehérjefoszforiláció vizsgálata

SDS-PAG elektroforézist követő Western blot analízis segítségével vizsgáltuk az OR8-peptidek hatását a fehérje foszforilációra BL41 sejtekben. A sejteket OR8-peptidekkel

és/vagy anti- μ -vel történő kezelés után lizáltuk, majd a lizátumot SDS poliakrilamid gélen megfuttattuk. Ezt követően a szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át. A továbbiakban foszfotirozin-specifikus, illetve az Erk és Akt foszforilált/aktivált formájára specifikus elsődleges ellenanyagokkal, majd HRPO-val konjugált másodlagos ellenanyaggal kezeltük a nitrocellulóz membránt. Az előhívást ECL (enhanced chemiluminescence) reagens segítségével végeztük. A kemilumineszcens jelet röntgenfilmen detektáltuk.

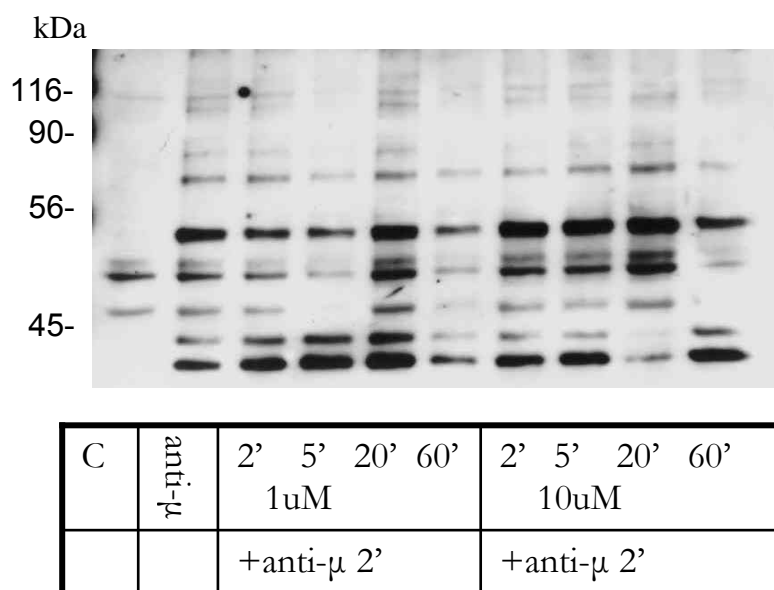
A sejteket különböző ideig kezeltük (2', 5', 20', 60') kétféle, az Fc γ RIIb foszforilált motívumait hordozó, membránpermeabilis peptiddel, két különböző koncentrációban (1 μ M, 10 μ M). Az OR8-RKPG szerinen foszforilált peptid egy 50 kDa körüli fehérje tirozin foszforilációját váltotta ki, melynek intenzitása a kisebb dózisú (1 μ M), 20 perces kezelésnél volt a legerőteljesebb. Az OR8-RKHPnppe, szerint nem foszforilált és tirozint foszforilált formában tartalmazó peptid önmagában nem indukálta fehérjék tirozin foszforilációját.

A továbbiakban a sejteket az előzőekben leírtak szerint előkezeltük a két permeabilis peptiddel, majd a peptid-kezelés utolsó két percében anti-BCR-el is stimuláltuk a sejteket. Ezután vizsgáltuk az összes fehérje tirozin foszforilációját, valamint az Erk ill. az Akt molekulák foszforilációját (13. és 14. ábra).



13.ábra: Az **OR8-RKPGpe** peptiddel különböző ideig előkezelt, majd **anti-IgM**-mel stimulált sejtekben kialakuló foszforilációs mintázat. WB: anti-foszfotirozin.

A tirozin foszforiláció vizsgálata azt mutatta, hogy az **OR8-RKPGpe** foszfopeptiddel való rövid előkezelés jelentősen csökkentette a BCR-en keresztül kiváltott foszforilációs jelet, míg a hosszabb kezelés (20') szelektíven fokozta bizonyos fehérjék -köztük az 50 kDa körüli-foszforilációját. Nagyobb dózissnál (10 μ M) csak a foszforiláció gátlása érvényesült, ami a kezelési idő előrehaladtával fokozatosan megszűnt (13. ábra). Az **OR8-RKHP nppe** peptid, amely csak a foszfotirozint tartalmazta, ettől eltérő képet mutatott. A 20 perces előkezelés ugyan itt is kissé fokozta néhány fehérje tirozin foszforilációját és ez a hatás 60 perc után megszűnt, míg 10 μ M koncentrációban adva az OR8-RKHPnppe peptid szelektíven, és időtől függő módon fokozta bizonyos fehérjék foszforilációját (14. ábra).



14.ábra: Az **OR8-RKHPnpp** peptiddel különböző ideig előkezelt, majd **anti-IgM**-mel stimulált sejtekben kialakuló foszforilációs mintázat. WB: anti-foszfotirozin

Az Erk aktivációt vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az OR8-RKHP peptiddel és anti-IgM-el kezelt mintákban erősödött az Erk kináz foszforilációja a csak anti-IgM-el kezelt mintákhoz képest. A legerőteljesebb Erk foszforilációt az 1uM-os peptid dózis 20 perces előinkubálásánál figyelhettük meg. Az előzőhöz hasonlóan az OR8-RKPG + anti-IgM-el kezelt mintákban is megfigyelhető az Erk foszforiláció erősödése, ebben az esetben is főként a 20 perces peptid előkezelést követően. Önmagában a peptidekkel kezelt mintákban nem tudtunk Erk foszforilációt kimutatni és az üres hordozó peptid is hatástalannak bizonyult.

Az Akt foszforiláció mértéke nem változott a peptidekkel előkezelt, majd anti-IgM-el aktivált mintákban sem dózis, sem idő függő módon, ill a peptidek önmagukban sem indukáltak Akt foszforilációt.

A sejtmembránon átjutó Fc γ RIIb peptidekkel végzett kísérletek alapján azt mondhatjuk, hogy a foszfopeptidek dózistól és kezelési időtől függő módon képesek beavatkozni mind pozitív, mind negatív módon B sejtek jelátviteli folyamataiba. Az RKHP feltehetőleg az SHP-2 foszfatáz természetes szubsztrátjaival kompetícióba lépve (hiszen az peptid rövid változata, az AEHP peptid jó szubsztrátja a foszfatáznak, l. 2. ábra) gátolja a foszfatáz defoszforiláló hatását és ezen keresztül lehetővé teszi bizonyos sejten belüli jeltovábbító fehérjék tirozin foszforilációjának fennmaradását.

A szerinen foszforilált RKPG peptid ezzel szemben alapvetően gátolja a BCR által kiváltott tirozin foszforilációs jelet. Ez egybevág azzal a korábbi eredménnyel, hogy a szerin helyett alanint tartalmazó Fc γ RIIb mutáns sejtekben nagyobb mértékű fehérje tirozin foszforilációt figyeltünk meg. Az RKPG által okozott tirozin foszforiláció emelést pillanatnyilag nem tudjuk magyarázni.

Az eredmények azt sugallják, hogy az Fc γ RIIb foszforilált motívumai negatív szerepet játszanak az antigén receptoron keresztül történő B sejt stimuláció során. Míg az ITIM tirozin foszforilációja gátolja a a BCR- Fc γ RIIb keresztkötött sejtekben a

Ca²⁺ jelet, valamint az Erk és az Akt foszforilációját, a BCR-en keresztül elindított sejtaktiváció a MAPK FcγRIIb-hoz való asszociációját váltja ki. A MAPK dokkoló helyeként jellemzett motívum szerinjének foszforilációja -valószínűleg az aktivációs küszöb emelésével- gátolja a BCR által indukált tirozin foszforilációt. Ez utóbbi hatás érvényesülhet az FcγRIIb ligandum kötésének hiányában is.

A projekt kapcsán előállítottunk több reagenst, illetve transzfektált sejtvonalakat, amelyek további kutatómunkát tesznek lehetővé. Az FcγRIIb-hoz kapcsolódó IgG Fc peptid segítségével lehetőség nyílik további szignalizációs folyamatok vizsgálatára, és B sejt gátló reagensok fejlesztésére, a sejtmembrán permeábilis foszfopeptideket alkalmazni kívánjuk különféle peptidok sejtbejuttatására, a GFP- FcγRIIb konstrukciót hordó sejtek segítségével pedig a receptor leválás (shedding) és a MAPK aktivitás összefüggéseit, a MAPK-nak a receptor internalizációban betöltött szerepét vizsgálhatjuk.